

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 58-225026

(43)Date of publication of application : 27.12.1983

(51)Int.Cl.

A61K 37/64
// A61K 35/22

(21)Application number : 57-108047

(71)Applicant : MOCHIDA PHARMACEUT CO LTD

(22)Date of filing : 23.06.1982

(72)Inventor : ONISHI HARUO
KOJIYAKU KOJI
ASHIDA YOSHIKAZU
SUZUKI YASUO
MOCHIDA SUGURU**(54) PREVENTIVE OR REMEDY FOR DISEASES CAUSED BY AMYLASE AND/OR LIPASE ACTIVITY EXASPERATION****(57)Abstract:**

PURPOSE: The titled preventive or remedy that contains tripsin inhbitor in human urine, as an active ingredient.

CONSTITUTION: Human urine tripsin inhibitor (UTI) is used as an active ingredient, to give a preventive or remedy for diseases caused by amylase and/or lipase activity exasperation. The UTI, as the active ingredient, is a glycoprotein of 17,000W70,000 molecular weight and obtained from human urine by purification. Namely, human urine is concentrated, passed through an arginine-cephalose column, then the column is eluted with 2% aqueous ammonia containing 0.2M NaCl. Then, the eluate is subjected to gel chromatography wth a Sephadex G-100 column to collect the UTI fraction. The product is effective in prevention and treatment for pimelosis, adiposis, lipoidosis, diabetes or arteriosclerosis. The dosage is 10,000W1,000,000 units/day and it is given orally, rectally or by injection or inhalation.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑨ 日本国特許庁 (JP)
⑩ 公開特許公報 (A)

⑪ 特許出願公開
昭58—225026

⑫ Int. Cl.³
A 61 K 37/64
// A 61 K 35/22

識別記号
A E D

庁内整理番号
7138—4C
7138—4C

⑬ 公開 昭和58年(1983)12月27日

発明の数 1
審査請求 未請求

(全 5 頁)

⑭ アミラーゼ活性および / またはリパーゼ活性
亢進に起因する疾患の予防および治療剤

⑮ 特 願 昭57—108047

⑯ 出 願 昭57(1982)6月23日

⑰ 発 明 者 大西治夫
船橋市東船橋6—4—14

⑱ 発 明 者 小雀浩司
横浜市中区本牧町4—1002—10

⑲ 発 明 者 芦田義和
川口市芝園3—15—704

⑳ 発 明 者 鈴木泰雄
川口市大字差間234—29

㉑ 発 明 者 持田英
東京都豊島区駒込2—5—4

㉒ 出 願 人 持田製薬株式会社
東京都新宿区四谷1丁目7番地

㉓ 代 理 人 弁理士 萼優美 外1名

明 細 書

1. 発明の名称

アミラーゼ活性および / またはリパーゼ活性亢
進に起因する疾患の予防および治療剤

2. 特許請求の範囲

ヒト尿中トリプシンインヒビターを有効成分と
するアミラーゼ活性および / またはリパーゼ活性
亢進に起因する疾患の予防および治療剤

3. 発明の詳細な説明

本発明はヒト尿中トリプシンインヒビターを有
効成分とするアミラーゼ活性および / またはリパ
ーゼ活性亢進に起因する疾患の予防および治療剤
に関する。

哺乳動物が炭水化物を含む食品を摂取した後に
過血糖症状が起ることが知られており、この症状
は炭水化物がアミラーゼ、マルターゼ等のグリコ
シド加水分解酵素により迅速にグルコースに分解
されることに起因する。この過血糖症状は糖尿病
の場合に特に強く、目づ長時間持続する。また、

この食餌性過血糖症状時に、さらに脂肪性食餌を
摂取するとインシュリンの強い分泌を起し、そ
のために更に脂肪合成の増大および脂肪分解の減
少の結果、体内に脂肪が蓄積される。

アミラーゼ活性阻害物質は生体内においてアミ
ラーゼ活性を阻害するので、これらの現象が抑制
され、そのため、肥満症、脂肪症、過剰脂質症、
糖尿病、糖尿病前期、肺炎等の生体内のアミラー
ゼが関与する疾患の予防あるいは治療剤として有
用である。

方、高脂血症は動脈硬化症進展の重要なリス
クファクターであることはよく知られているところ
であり、高脂血症を予防または治療するための
様々な薬剤が開発されている。

コレステロール、トリグリセリド、リン脂質等
の血清中の脂質の大部分は食餌に由来しており、
その過剰摂取および処理障害の結果生じる脂質の
不均衡により、高脂血症をきたすと考えられてい
る。従って、高脂血症の予防、ひいては動脈硬化
性疾患の予防に食餌療法が有用とされている。ま

た、同様の観点から食餌中の脂質の吸収をコントロールすることも動脈硬化症の発症および進展に重要な意義を有するものと考えられる。従って、食餌中の脂質の吸収に関与するリパーゼ活性を抑制し得る薬剤は血清中の脂質量を抑制し、ひいては動脈硬化性疾患を予防し得ることとなり、医薬としての有用性を期待し得るものである。

このような観点から、本発明者らはアミラーゼ活性およびリパーゼ活性を阻害する薬物は肥満症、糖尿病、動脈硬化症等のいわゆる成人病の予防および治療剤として極めて有用であるとの考えのもとに研究を重ねた結果、ヒト尿中トリプシンインヒビターがトリプシン活性のみならず、アミラーゼ活性およびリパーゼ活性をも阻害することを見出し、本発明を完成した。

本発明の治療剤の有効成分であるヒト尿中トリプシンインヒビター（以下、UTIという）は分子量17000～70000の分布を示す公知の糖蛋白質であり（プロクシェ（Proksh）、ジャーナル オブ ラボラトリー アンド クリニカ

健康成人尿650ℓを濃縮した後、脱イオン水に対して透析し、1規定水酸化ナトリウム溶液でpH7.8に調整し、次いで0.05Mトリス-塩酸緩衝液（pH7.8）で十分に平衡化したDFAEセルロースカラム（20×80cm）を通過させる。同緩衝液40ℓで洗浄した後、0.3M塩化ナトリウムを含む同緩衝液を用いて吸着しているUTIを溶出させ、次いで60℃、20分間の加熱処理を行ない、混入しているプロテアーゼを失活せしめ、UTIの分解を防止して、粗製UTI520万Uを得た。

このようにして得た粗製UTI520万Uを、0.02Mグリシン-塩酸緩衝液（pH3.4）に溶解し、一夜透析した後、同緩衝液で平衡化したDEAEセルロースカラム（8.0×60cm）に吸着させた。このカラムを同緩衝液10ℓ、次に0.2M塩化ナトリウムを含む同緩衝液10ℓで順次洗浄した後、0.4M塩化ナトリウムを含む同緩衝液8ℓでUTIを溶出した。活性画分を限外濃縮法で濃縮した後、発熱性物質を含まない

特開昭58-225026 (2)

ル メディシン（J. Lab. Clin. Med.）79巻 491頁 1972年）、例えば須見らの方法（ジャーナル オブ バイオケミストリー（J. Biochem.）83巻 141頁 1978年）により、ヒト尿から精製することができる。即ち、適当な方法によりヒト尿を濃縮してアルギニン-セファロース カラムを通過させた後、このカラムを0.2M塩化ナトリウムを含む2%アンモニア水で溶出する。次いで、常法により、溶出液をセファデックスG-100のカラムにかけてゲルクロマトグラフィーを行ない、UTI分画を得る。このようにして精製したUTIは分子量約67000、等電点pH2～3、5～12%の中性糖を含む酸性糖蛋白質である。

UTIの製法を更に製造例によって示す。

製造例

プロクシェ（Proksh）の方法（ジャーナル オブ ラボラトリー アンド クリニカル メディシン（J. Lab. Clin. Med.）79巻 491頁 1972年）に準じた。

ように調整したセファデックスG-100（ファルマシア社）を充填したカラム（10×95cm）を用い、生理食塩水を展開溶媒として用いUTI分画を得た。

なお、UTIの活性は、カッセル（Kasell）の方法（メソッド イン エンザイモロジー（Methods in Enzymology）19巻 844頁 1970年）に準じ、ウストリプシン（3000NFU/mg、マイルズ社）1μgを100%阻害するUTI量を1Uとしたときの比活性は2500U/mgであった。

次に、UTIの作用及び毒性を実験例によって説明する。

実験例1 アミラーゼ活性阻害作用

UTIのアミラーゼ活性阻害作用をブルースターチ法によって測定した。ブタ膵臓由来のα-アミラーゼ（904U/mg、Washington）を1/1000M塩化カルシウムを含む生理食塩水で希釈して1U/mlの溶液とした。この溶液0.5mlにUTIの生理食塩水溶液0.5ml及びイオン交

換水3.0mlを加えて37℃に10分間インキュベーションした。その後、ブラスターチ錠(シオノギ)1錠を加えて10分間振盪し、更に37℃で5分間インキュベーションした。0.5N-水酸化ナトリウム溶液1.0mlを加えた後3500rpmで5分間遠心分離し、上清液の吸光度を620nmで測定し、標準曲線からアミラーゼ活性を測定した。対照はUTIを加えないで同様に測定した。UTIのアミラーゼ活性阻害率は次式によって算出した。

活性阻害率(%) = $(1 - (\text{UTI添加時のアミラーゼ活性} / \text{対照のアミラーゼ活性})) \times 100$

UTIの用量とアミラーゼ阻害活性との関係は第1図に示す通りであり、この図から50%阻害濃度を算出すると2500U/mlであった。

実験例2 鳥アミラーゼ血症抑制作用

胆石症および胃ガン手術を受けた患者の中で、鳥アミラーゼ血症の認められた6例について、U

1万Uを1日1回静脈内注射した。最終投与日から1週間後に血清アミラーゼ活性をブラスターチポリマーを用いた色素澱粉法を用いて、血筋筋をグルコースオキシダーゼ法を用いて測定した。結果を第2表に示した。UTI投与により血清アミラーゼ活性の減少とともに、血筋筋の低下を認めた。

	UTI投与 前の値	UTI投与 1週間後の値
アミラーゼ活性 (U* / dl)	413	113
血筋筋 (mg / dl)	154	91

* Somogyi単位

実験例4 リパーゼ活性阻害作用

UTIのリパーゼ活性阻害作用をクロオカ(Kurooka)らの方法(ジャーナル オブ バイオケミストリー(J. Biochem.) 81巻 361頁 1977年)に準じて測定した。即ち、豚膵臓

特開昭58-225026 (3)

UTI 1万Uを1日1回、1週間静注した。最終投与日から1週間後に採血し、血清アミラーゼ活性をブラスターチポリマーを用いた色素澱粉法を用いて測定した。

結果を第1表に示した。UTI投与により6例中4例にアミラーゼ活性の低下が認められ、特に術後高アミラーゼ血症に至った1例は正常値に復した。

第1表

症 例	血清アミラーゼ活性 (U* / dl)	
	前 値	UTI投与後の値
1	335	224
2	464	310
3	283	124
4	884	790
5	198	180
6	305	140

* Somogyi単位

実験例3 血筋抑制作用

高アミラーゼ血症を呈した糖尿病患者にUTI

由米のリパーゼ(50U/ml)0.1mlにUTI0.1mlおよびフェニルメチルスルフォニルフルオリド(phenylmethylsulfonyl fluoride)0.05ml加えて37℃で10分間インキュベーションした。その後、5,5'-ジチオビス2-ニトロベンゾイックアシッド(5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid))1mlを加えて30℃で5分間インキュベーションし、更に、2,3-ジメルカプト-1-プロパノールトリブチレート(2,3-dimercapto-1-propanol tributylate)0.1mlを加えて10分間インキュベーションした。反応終了後アセトン2mlを加えて3500rpmで10分間遠心分離し、上清の吸光度を412nmで測定し、標準曲線からリパーゼ活性を測定した。対照はUTIを加えないで同様に測定した。UTIのリパーゼ活性阻害率は次式によって算出した。

阻害率(%) = $(1 - (\text{UTI添加時のリパーゼ活性} / \text{対照のリパーゼ活性})) \times 100$

UTIの用量とリパーゼ阻害活性との関係は第2図に示す通りであり、この図から50%阻害濃度を算出すると170U/㎖であった。

実験例5

1群10匹のウィスター系雄性ラット(体重200g)を用い、林らの方法(応用薬理 14巻 679頁 1977年)に準じて高脂血症を誘発した。即ち、ココナッツオイル(ヤシ油200g)にアラビアゴム100gを加え、精製水にて1000㎖とした)20㎖/kgを経口投与した。腸溶コーティングしたUTIをココナッツオイル投与30分前に経口投与した。結果を第3表に示した。UTI30万U/kg投与群は対照群に比べ中性脂肪は低値であった。

利であるが、経口投与剤、直腸内投与剤あるいは吸入剤とすることもできる。注射剤は凍結乾燥剤とするのが好ましく、吸入剤も同様の剤形とするのが好ましい。経口投与剤としてはカプセル剤、錠剤、顆粒剤、散剤あるいは経口用液体製剤とすることができ、要すれば腸溶剤とする。

UTIの治療量は1日当り1万～100万Uであるが、症状あるいは投与経路に応じて適宜増減してさしつかえない。

次に、実施例を示すが本発明はこれのみに限定されるものではない。

実施例1

UTI 1000万Uを200㎖の生理食塩水に溶解し、メンブランフィルターを用いて無菌的に濾過する。濾液を滅菌したガラス容器に1㎖ずつ充填して凍結乾燥し、これを密栓して凍結乾燥粉末製剤とする。

第3表

中性脂肪		(mg/dl)
対 照 群		115.3±24.1
UTI 10万U/kg		86.1±6.4
30万U/kg		73.8±5.9

実験例6 急性毒性

6週令のddY系マウスを1群10匹とした。UTI100万U/kgを生理食塩水に溶解して静脈内または腹腔内に注射し、7日間経過を観察したが、何ら異常を認めなかった。

以上のようにUTIはヒト由来であり、毒性も低いことから生体内のアミラーゼ活性および/またはリパーゼ活性を阻害する必要がある疾患例えば、肥満症、脂肪症、過剰脂質症、糖尿病、糖尿病前期、肺炎、高脂血症、動脈硬化症等の予防剤および治療剤として有用である。

UTIは任意、慣用の製薬用担体あるいは賦形剤とともに慣用の方法で医薬用製剤に調製することができる。通常は注射剤として使用するのがある。

実施例2

UTI	1000億U
乳糖	3.2Kg
ポテト澱粉	1.5Kg
ポリビニールアルコール	0.15Kg
ステアリン酸マグネシウム	0.15Kg

上記成分をそれぞれ秤量し、UTI、乳糖およびポテト澱粉を均一に混合する。この混合物にポリビニールアルコールの水溶液を加え、湿式顆粒造粒法により顆粒を調製する。この顆粒を乾燥し、ステアリン酸マグネシウムを混合した後、圧縮打錠して重量100mgの錠剤とし、常法により腸溶錠とする。

実施例3

卵黄レシチンとコレステロールとジアセチルホスフォートと7対2対1のモル比で混合し、その100mgを12.5㎖のクロロホルムに溶解し、フラスコ壁に薄いフィルムを調製した。このフィルムとUTI100mgを含むリン酸緩衝液25㎖を混合し、分散液を調製した。超音波処理後、

特開昭58-225026 (5)

1100000にて遠心し、得られた沈殿を3mlの生理食塩水に懸濁し、滅菌処理後、UTI含有リボソーム封入製剤を切る。

4. 図面の簡単な説明

第1図は実験例1の結果を示すグラフ、第2図は実験例4の結果を示すグラフである。

